

MALİGN MELANOMDA SERUM P53 ONKOPROTEİN DÜZEYLERİ

Uğur ÖZBEK, Zeynep ŞENGÜN, Sıdıka KURUL, Adnan AYDINER,
Nurcan ERTÜRK, Erkan TOPUZ

I. Ü. Onkoloji Enstitüsü

ÖZET

p53, SV 40 ile trasforme edilmiş hücrelerde bulunmuş ve tanımlanmış bir nukleer fosfoproteindir. p53'ün mutasyona uğramamış ya da 'wild-type' formu, hücre bölünmesinde negatif regülatör rolü olan bir tümör-supressör gen olarak kabul edilir. p53 geninin yüksek oranda korunmuş dizilerinden birinde nokta mutasyonu ortaya çıktığında, aktive olmuş onkogen ürünü özellikleri gösteren bir mutant protein eksprese edilir.

p53 proteini monoklonal antikorlarla ayırt edilebilir. Mutant p53 serum düzeyleri 37 primer MM kanser hastasında, enzim immünassay yöntemi ile ölçüldü. MM hasta grubunda mutant p53 ortalama değeri 0,13±0,13 ng/ml, kontrol grubunda ise 0,14±0,15 ng/ml dir, ve 2 grup arasında istatistiksel bir anlamlılık yoktur ($p>0,05$).

Anahtar Kelimeler : p53, tümör-supressör gen, mutasyon, Malign Melanom

GİRİŞ

p53, 1979'da keşfedilen 53 kb'lık bir nukleer fosfoproteindir. SV 40 ile trasforme hücrelerde, trasforme protein olan büyük T antijenine bağlanma özelliği gösterir. Bununla birlikte, Adenovirus E1B, Tip 16 ve 18 Papilloma virus E6 proteinine de bağlanır.

İnsan p53 geni, 17. kromozomun kısa kolup p13.1 bölgesine lokalize edilmiştir^(1,2).

P53 geninin genomik organizasyonu, değişik canlılarda benzerlik gösterir. Gen 10 intron ile 11 exon dan oluşur. İnsan ve farelerdeki ilk intron genellikle uzundur. 1.exon hiçbir canlıda kodlanmaz. 2,4,5,7 ve 8. exonlarda amino asit (aa) kodlayan 5 bölge, evolüsyonda korunmuş bölgeler olarak tanımlanmıştır^(2,4,5,6). Gen ekspresyonunun regülasyonu ise, bazı

SUMMARY

p53 is a nuclear phosphoprotein discovered and identified in SV 40 transformed cells. In its nonmutated or 'wild-type' state, p53 is considered to be a tumor suppressor gene product functioning as a negative regulator of cell division. The point mutation occur in one of highly conserved sequences of the p53 gene, a mutant protein is exhibiting characteristics of an activated oncogene product.

Mutant and wild-type p53 protein can be distinguished with monoclonal antibodies. Mutant p53 serum levels were measured by ELISA assay, in 37 primer MM cancer patients.

In MM cancer patients group the mean Mutant p53 level was 0,13±0,13 ng/ml, in control group it was 0,14±0,15 ng/ml, and there was no statistical significance between them ($p>0,05$).

Key Words : p53, tumor-suppressor gene, mutation, Malignant Melanoma

sistemlerde transkripsiyon ya da transkripsiyon sonrası evrede olur.

p53 geni, solid tümörlerde yapısı en çok değişen gen olarak saptanmıştır. p53 genine ait iki mekanizma öne sürülmüştür. İlk yapılan çalışmalarda, p53 plazmidleri, aktive edilmiş ras ile birlikte, kültürde erken evrede transformasyona neden olmuşlardır. Bu, p53'ün onkogenik bir özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. p53'ün hücre proliferasyonunda kontrol rolü üstlendiği ise, inhibe hücrelere p53 mikroenjeksiyonu ile de doğrulanmıştır⁽¹⁻³⁾.

Bunlara paralel yürüyen çalışmalarda, Friend virusu ile etkilenmiş sıçan eritrolösemilerinde her iki kromozomda da p53 gen mutasyonları gözlenmiştir. Bu da, p53 geninin bir tümör supressör gen olduğunu

düşündürmüştür^(1,5).

Daha sonraki çalışmalarla, 'wild-type' p53'ün hücre bölünmesini ve büyümesini regüle eden bir tümör süpresör gen gibi çalıştığı, bunun yanında mutant p53'ün ise immortalizasyon ve transformasyon özelliğine sahip olduğu anlaşılmıştır^(1,4).

p53'ün 'wild-type' formu, tümör süpresör yapıda olmasına karşın, çeşitli mutasyonlar (delesyon, nokta mutasyonu gibi), bu etkiyi inaktive edecek şekilde ortaya çıkar. Mutant p53'ün aktivasyon mekanizması, normal p53'e bağlanmak ve nötralize etmek şeklinde de olabilir.

'Wild-type' p53, mutant p53'e karşı kompetisyona girebilir, ve mutant p53'ün transformasyon potansiyelini belirgin bir biçimde azaltır. Bazı çalışmalar mutant p53'ün, 'wild-type' p53 ile kompetisyona girmesinden başka, farklı fonksiyonları da olduğunu göstermiştir^(1,2). p53 eksprese edilmeyen hücre soylarına mutant p53 transfeksiyonunun tümör gelişimini arttırması bu fikri destekler^(3,4).

Bu çalışmaların insan tümörlerine uygulanmasıyla 3 aşamalı p53 gen aktivasyon mekanizması ileri sürülmüştür⁽¹⁾;

- 1- Büyüme faktörü bağımlılığının kaybı,
- 2- p53'de mutasyon
- 3- Normal allel taşıyan 17p'nin kaybı.

'Wild-type' p53'ün kaybı ve mutant formun ekspresyonu malign tümörlerden kolon, meme ve beyinde, düşük oranda da karaciğer, mesane, özefagus, baş-boyun tümörleri ve sarkomlarda gösterilmiştir. Son yayınlarda, cilt kanserlerinde, hem squamoz hücre karsinomu, hem de bazal hücre karsinomlarında p53 geninde yüksek oranda mutasyon bildirilmiştir^(3,4,6).

Dizi analizleri ile yapılan çalışmalarda, Malign Melanom'da (MM) p53 geninin dizi analizi henüz tamamlanmamıştır. Bunun yanında, MM hücre soylarında mutant p53'ün dizi analizlerinde 248. kodonda transisyon nokta mutasyonu (C-T) (purin ile primidin arası baz değişimi) gözlenmiştir. Derini bazal hücre ve squamoz hücre karsinomlarında da bu mutasyon sık görülür.

Genelde bu tip bir mutasyon UV ışığın etkisiyle de meydana gelebilir. Bu görüş melanositlerin transformasyonunda, UV ışığın

patojenik bir rolü olduğu fikrini destekler^(2,3,4).

İnsan tümörlerinde p53 gen ekspresyon tayini için birçok metod kullanılır. İçlerinde en kullanışlı olan serum düzeylerinin ölçülmesi yöntemidir.

Mutasyonlar, mRNA ekspresyonunda ve molekül ağırlığında önemli bir değişiklik meydana getirmezler. Bu yüzden antikör kullanımı, ölçülebilir düzeyde mutant p53 eksprese eden primer tümörlerde yararlanılacak en uygun yöntemdir⁽¹⁾.

Bununla birlikte, patolojik boyalarda kullanılan antikörler, stoplazmadaki diğer bazı proteinlerle çapraz reaksiyon gösterdiğinde, yanıltıcı bir stoplazmik boyanma meydana getirir. Bu olay nükleer onkogenler için bir problem olmasına rağmen, mutant p53'ün hücredeki lokalizasyonu değerlendirilirken, yanıltıcı değişiklikler gözlenebilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, 1993-94 yılları arasında, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsünde prospektif olarak hazırlanmıştır. Mutant p53 düzeyleri, randomize olarak toplanmış sağlıklı 10 kontrol ve 37 tedavi öncesi (TÖ) MM hastasının serumlarında ölçülmüştür. Kontrol grubu ve kanserli hastaların serumları, kan alındıktan sonra ayrılmış ve gerekli sayı sağlanıncaya kadar -20° C'de saklanmıştır.

MM hasta grubunun 25'i erkek, 12'si kadın hastadan oluşmuştur. Yaş ortalamaları 49,53±13,69'dır. Mutant p53 düzeylerine enzim immünassay (ELISA) yöntemi ile bakılmıştır (Oncogene Science, Inc. 1991, USA).

İstatistik verilerin elde edilmesinde Student-T testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmamızda, kontrol ve hastaların mutant p53 düzeyleri, yöntemde kullanılan standart değerler içinde kalmıştır. Hasta değerlerinden biri, diğerlerine nazaran oldukça yüksek düzeyde ölçüldüğü için, istatistiki anlamlılığı etkilememesi açısından çalışma dışında bırakılmıştır. İstatistiki değerlendirmeler 36 MM hastası üzerinden yapılmıştır. Kontrol grubundan elde edilen ortalama mutant p53 değeri 0,14±0,15 ng/ml ve MM hasta grubundan elde edilen ortalama değer ise 0,13±0,13 ng/ml

olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre kontrol grubu ve MM hasta grubu arasında anlamlı bir fark görülmektedir ($T=0.153$, $sd=13$, $p>0,05$).

TARTIŞMA

p53 geni, insan tümörlerinde en fazla değişikliğe uğradığı gösterilmiş gendir. p53'ün tümör gelişimindeki tahmini rolü, düşünüldüğünde, hızlı proliferasyon, zayıf diferansiyasyon ya da kötü prognozla ilişkisi açısından marker olabileceği umulmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, 'wild-type' p53'ün kaybı ve mutant formun ekspresyonu malign tümörlerde çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir. Çalışmaların çoğu, sıçan ve insan hücre soylarında yapılmıştır ve sadece birkaç tümör bu mutasyonun mekanizması açısından incelenmiştir⁽¹⁾.

İnsan tümörlerinde p53'ün ekspresyonunun tayini için birçok metod kullanılır. Sıklıkla kullanılan moleküler genetik yöntemlerde, DNA-SSCP, PCR, Southern Blot gibi teknikler kullanılır.

Orita ve ark. çalışmalarında DNA-SSCP ile hasta mutasyonunu tespit etmişlerdir. Bunun yanında, MM hücre soylarından elde edilen komplementer DNA ile yapılan çalışmalarda ise, Melanoma hücre soylarının %15'inde korunan bölgeler dışında mutasyon saptanmıştır^(1,2,5).

p53 proteini üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli tekniklere uygun antikolar geliştirilmiştir. İmmunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerde kullanılan PAb 240 ve PAb 1801 antikoları, epitoplari tanı ve kısmen mutant p53 tarafından eksprese edilmiştir. Buna benzer şekilde, yalnız 'wild-type' p53'ü tanıyan antikolar da tanımlanmıştır^(1,3,4,5).

İmmunohistokimyasal boyamalarda, boyaların p53 protein konformasyonunu değiştirdiği durumlarda mutant p53 ile 'wild-type' p53 taşıyan hücre soyları tamamıyla

birbirinden ayırt edilemez. 9 melanoma hücre soyunda PAb1801 antikoru ile yapılan çalışmada yalnız 1 hücre soyunda p53'ün aşırı ekspresyonu gösterilebilmiştir⁽⁴⁾.

Bununla birlikte, bu antikoların MM tümörlü hasta serumları üzerinde kullanılması henüz deneme aşamasındadır. Bizim çalışmamızda 36 MM hastasından elde edilen serumlar ELISA yöntemiyle mutant p53 proteini açısından incelenmiştir. Kullanılan kontroller, tamamen sağlıklı, hiçbir tümör taşımayan olgulardan elde edilen serumlardan toplanmıştır. Testin sonunda, TÖ MM hastalarının serum onkoprotein düzeyleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Zeynep ŞENGÜN

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü,

34590 Topkapı - İSTANBUL

KAYNAKLAR

1. Harris A.L.; Mutant p53- The Commonest genetic Abnormality in Human Cancer?, Journal of Pathol, 162,5-6 (1990)
2. Chiang F., Syrjanen S., Tervahauta A., Syrjanen K.; Tumorigenesis associated with the p53 Tumour Suppressor Gene, Br. J. cancer 68,653(1993)
3. Montenarh M. Biochemical, Immunological, and Functional Aspects of the Growth-Suppressor/Oncoprotein p53, Critical Reviews in Oncogenesis, 3,223 (1992)
4. Weiss J., Schwechheimer K., Cavenee K.W., Herly M., Arden C.K.; Mutation and Expression of the p53 Gene in Malignant Melanoma Cell Lines, Int. J. Cancer, 51, 693 (1993)
5. Albino A.P., Shea C.R., Mc Nutt N.S.; Oncogenes in melanomas, The Journal of Dermatol. 19,853 (1992)
6. Donchower L.a., Bradley A.; The Tumor Suppressor p53, Biochimica et Biophysica acta, 1155, 181 (1993)
7. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. Harris C.C.; p53 Mutations in Human Cancers, Science, 253,49(1991)